

氏 名	Venny Santosa
学 位 の 専 攻 分 野 の 名 称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	甲理第147号 (文部科学省への報告番号甲第480号)
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位授与年月日	2013年 3 月16日
学 位 論 文 題 目	The Fission Yeast MCM-binding Protein, Mcb1, Regulates MCM Function during Pre-Replicative Complex Formation in DNA Replication
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 矢 倉 達 夫 (副査) 教 授 大 谷 清 教 授 田 中 克 典

細胞は細胞周期の DNA 合成 (S) 期に染色体 DNA を正確に倍加し、分裂 (M) 期にそれらを娘細胞に分配することで自己複製を行う。染色体を正確に倍加するということは、同一の染色体をもう一組つくるということであり、この過程は DNA の複製と呼ばれている。真核生物の染色体 DNA の複製は、S 期に一度だけ起こるように厳密に制御されている。この制御に破綻が生じると、細胞あたりの DNA 量が変化したり、一部の染色体 DNA 領域が増幅したりすることによって、細胞は正常な増殖に支障をきたし、細胞のがん化の原因ともなる。

この染色体 DNA 複製の制御は、主として複製の開始過程で行われている。その複製の開始過程には、様々な因子が複雑かつ巧妙に関与している。まず複製開始点に複製開始点認識複合体 ORC が結合する。G1期に結合した ORC 依存的に Cdc6 と Cdt1 がそれぞれ独立的に染色体上に結合し、それにより DNA 巻き戻しタンパク質 (ヘリカーゼ) である MCM 複合体が複製起点に導入され、複製開始前複合体 (pre-RC: pre-replicative complex) が形成される。S 期へ移行する際には、DDK および CDK の二つのリン酸化酵素により pre-RC が活性化されることによって、複製が開始される。この複製開始過程において、Mcm2 ~ Mcm7 の 6 量体からなる MCM 複合体は、DNA 合成に先立って鋳型 2 本鎖 DNA を一本鎖に解離させる DNA ヘリカーゼとして機能する。MCM 複合体は、結合した DNA に細胞周期で一度のみ DNA 複製を許可する DNA 複製ライセンス因子としての機能を有している。よって、細胞周期での MCM 複合体の活性化と不活性化の仕組みは、正常な染色体の複製に極めて重要な役割を果たしている。本研究は、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を真核生物の染色体 DNA 複製機構の普遍性理解のモデル生物として利用し、MCM 複合体の機能制御機構の詳細を明らかにすることを目的に行われた。

論 文 内 容 の 要 旨

MCM 複合体は、真核生物の染色体 DNA 複製ヘリカーゼであり、且つ複製ライセンス因子としての機能も有する。その MCM 複合体の機能を制御する因子として、近年は乳類を始め幾つかのモデル生物において、新たな MCM 結合タンパク質として MCM-BP (MCM Binding Protein) が発見された。MCM-BP に関しては既に幾つかの報告がなされていたが、その機能実体に関してはそれぞれの実験系およびモデル生物種間で見解が異なっており、統一的な見解がなされていない状態であった。そこで、真核生物の染色体複製機構の普遍性理解のモデル生物として極めて優れ、遺伝学および生化学的解析が駆使可能な分裂酵母

Schizosaccharomyces pombe を用い、この問題への一定の解決を目指した。

まず、分裂酵母における MCM-BP ホモログである Mcb1 タンパク質が、MCM 複合体と実際に結合する能力を有しているか検討した。その結果、分裂酵母細胞内で Mcb1 タンパク質は細胞周期を通じて MCM 複合体と安定に結合することを確認した。興味深いことに、他の生物種ではその結合が確認されていない Mcm2 タンパク質との結合も弱いながら確認することができた。並行して、Mcb1 タンパク質と個々の MCM サブユニットとの結合を酵母 two-hybrid 法およびタンパク質共沈殿法にて調べた結果、Mcb1 タンパク質は Mcm2~Mcm7 の個々のサブユニットとそれぞれ結合する能力を有していることが明らかとなった。

次に、Mcb1 タンパク質の機能を明らかにするために、*mcb1*⁺ 遺伝子の条件致死変異株の取得を試みた。その結果、低温では生育可能であるが高温では生育不可能となる 2 種類の高温感受性株 (*mcb1*^{ts} 株) の取得に成功した。そしてこれらの変異株では、*mcb1*⁺ 遺伝子がコードする Mcb1 タンパク質の 254 番目のアミノ酸であるロイシンがプロリンに、363 番目のロイシンがプロリンにそれぞれ変異していることを明らかにした。*mcb1*^{ts} 株は、DNA 複製を阻害する薬剤に高感受性を示し、DNA 複製開始に関与する因子の変異株の多くと合成生育阻害的な表現型を示した。また、*mcb1*^{ts} 株の高温では生育できないという表現型は、MCM 複合体構成サブユニットの一つである Mcm5 タンパク質を高発現させることや、S 期サイクリンである Cig2 タンパク質の発現低下により、部分的に相補可能であることを見いだした。これらの事実は、*mcb1*^{ts} 株では DNA 複製開始過程の複製開始前複合体 (pre-RC) 形成の過程に何らかの欠陥を有することを強く示唆するものであった。

そこで、実際に *mcb1*^{ts} 株が DNA 複製開始過程に欠陥を有するかどうかを検討した。その結果、*mcb1*^{ts} 株では生育可能な許容温度においても細胞周期の S 期の進行に遅延が生じ、複製開始点への MCM 複合体の結合に顕著な低下が見られた。よって、*mcb1*^{ts} 株では MCM 複合体の複製起点への結合に欠損が生じ、その結果複製開始の効率が低下していることが明らかとなり、Mcb1 タンパク質が MCM 複合体の機能を制御することが強く示唆された。

次に、Mcb1 タンパク質による MCM 複合体の機能制御の仕組みを理解するために、変異 Mcb1 タンパク質 (*mcb1*^{ts}) と MCM 複合体の *in vivo* での結合状態を検討した。その結果、生育可能な許容温度においても *mcb1*^{ts} タンパク質と MCM 複合体との結合は著しく低下していることが分かった。さらに、Mcb1^{ts} タンパク質と個々の MCM サブユニットとの結合を酵母 two-hybrid 法およびタンパク質共沈殿法にて調べた結果、Mcb1^{ts} タンパク質は Mcm2~Mcm7 の個々のサブユニットとの結合をほぼすべて失っていることが分かった。

最後に、MCM タンパク質の細胞内局在性の観点から検証を行った。分裂酵母では、MCM 複合体構成タンパク質は細胞周期を通して核内に局在し、クロマチンへの結合状態を変化させることで複製開始を制御している。MCM 複合体構成タンパク質である Mcm2~Mcm7 に GFP または RFP 蛍光タンパク質を融合させ、*mcb1*^{ts} 変異が MCM タンパク質の細胞内局在に与える影響を調べた。その結果、*mcb1*^{ts} 株では非許容温度条件下において Mcm2~Mcm7 タンパク質のほとんどにおいて核局在性が損なわれ、細胞質に局在していた。これらの事実は、Mcb1 タンパク質が機能的な MCM 複合体形成に必要な役割を果たすことを強く示唆するものであった。

興味深いことに、出芽酵母では MCM 複合体構成タンパク質は S 期にのみ核局在を示し、それ以外の時期には核外へ排出され細胞質に局在する。さらに、出芽酵母には MCM-BP ホモログは見つかっておらず、ゲノム配列情報からもその存在の可能性は否定的である。これらを総合して、Mcb1 タンパク質は各 MCM 構成サブユニットとの相互作用により、核内での機能的な MCM 複合体の形成の促進・維持に関与しているという新たなモデルを提唱するに至った。

論文審査結果の要旨

真核生物の染色体 DNA の複製は、S 期に一度だけ起こるように厳密に制御されている。この制御に破綻が生じると、細胞あたりの DNA 量が変化したり、一部の染色体 DNA 領域が増幅したりすることによって、細胞は正常な増殖に支障をきたし、細胞のがん化の原因ともなる。MCM 複合体は、真核生物の染色体 DNA 複製ヘリカーゼであり、且つ複製ライセンス因子としての機能も有する。よって、細胞周期での MCM 複合体の活性化と不活性化の仕組みは、正常な染色体の複製に極めて重要な役割を果たしている。

本学位論文は、分裂酵母の MCM 複合体結合タンパク質 (MCM-BP : MCM Binding Protein) である Mcb1 に着目している。遺伝学的手法によりその機能条件欠損変異体を取得し、その変異体の表現型を手がかりとして Mcb1 の機能について詳細な解析を実施し、Mcb1 が如何に MCM 複合体の機能を制御するかに関して新たなモデルを提唱したものである。

筆者は、分裂酵母というモデル生物系の特性を最大限に生かし、遺伝学的手法により *mcb1*⁺ 遺伝子の条件致死変異株の取得を試み、高温でのみ増殖が不可能となる 2 種類の *mcb1* 変異体の取得に成功した。次いで、その単離した *mcb1* 条件致死変異体の表現型解析、機能欠損の実体の解明、遺伝学的スクリーニングによる機能関連遺伝子の単離、等の多岐にわたる緻密且つ詳細な解析を行い、その結果 Mcb1 タンパク質は各 MCM 構成サブユニットとの相互作用により、核内での機能的な MCM 複合体の形成の促進・維持に関与しているという新たなモデルを提唱することに成功した。卓越した酵母の遺伝学および生化学的手法の駆使によって提唱されたこのモデルは、分裂酵母のみならず真核生物全般にあてはまる普遍的なものであり、MCM 複合体の機能を制御するキータンパク質としての MCM-BP 機能の実体解明にブレークスルーをもたらした。

本論文の研究成果はすでにアメリカ生化学分子生物学会誌 *The Journal of Biological Chemistry* に公表されている。特筆すべきことに、公表論文は卓越した論文として Faculty of 1000 に選定され、その国際的な評価は極めて高いと言える。さらに、国内外での会議で本論文の内容を自ら報告している。特に、2011 年ボストンで開催された分裂酵母国際会議で口頭発表し、国内の学会においても 3 件の口頭発表に選ばれ、発表を行っている。筆者は審査会および公聴会において研究内容を的確に表現する能力を持つとともに、質疑を通してその研究分野について幅広く深い知識を持つことが確認された。

以上により審査委員会は本論文の著者が博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を持つと判定した。